

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 600 460 A1**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **93119354.4**

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **C07D 475/04**, **C07D 487/14**

22 Anmeldetag: **01.12.93**

30 Priorität: **01.12.92 CH 3674/92**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**08.06.94 Patentblatt 94/23**

84 Benannte Vertragsstaaten:  
**CH DE ES FR GB IT LI**

71 Anmelder: **SAPEC S.A. FINE CHEMICALS**  
**P.O. Box 234,**  
**Barbengo**  
**CH-6903 Lugano(CH)**

72 Erfinder: **Jéquier, Pascal**  
**Cantine di Cima 8**  
**CH-6815 Melide(CH)**  
Erfinder: **Marazza, Fabrizio**  
**Rombosco**  
**CH-6986 Novaggio(CH)**

74 Vertreter: **Zink-Wild, Markus Peter**  
**Patentanwaltsbüro Zink,**  
**Birchlistrasse 11**  
**CH-8173 Riedt-Neerach (Zürich) (CH)**

54 Verfahren zur Herstellung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure.

57 (6S)-THF wird erhalten, indem man zu einer wässrigen Lösung eines (6RS)-Diastereoisomerengemisches eines Alkalimetallsalzes von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure bei einer Temperatur von 5 °C bis 80 °C zwecks selektiver Kristallisation so lange portionenweise Säure hinzugibt, bis sich der pH-Wert auf einen Wert im Bereich von 4,8 bis 5,3 stabilisiert hat, und den entstandenen Festkörper, nämlich (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, abtrennt.

(6S)-THF kann als Ausgangsmaterial zur Herstellung von (6S)-N(5)-Formyl-THF, (6S)-N(5)-Methyl-THF und (6R)-N(5),N(10)-Methylen-THF verwendet werden.

EP 0 600 460 A1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure. 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure wird hierin manchmal mit THF abgekürzt.

Eine Synthese von diastereoisomerenreinen reduzierten Folaten sowie deren Bedeutung im pharmazeutischen Bereich sind in der europäischen Patentanmeldung Nr. 91 905 831.3-2101, Veröffentlichungs-Nr. 0 471 820 beschrieben.

Mit diesen Hinweis werden die in dieser Veröffentlichung enthaltenen Aussagen als hierin offenbart betrachtet.

In der europäischen Patentanmeldung Nr. 91 121 326.2, Veröffentlichungs-Nr. 0 495 204 A1 wird unter anderem ein Verfahren zur Herstellung von (6S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure via die fraktionierte Kristallisation von entsprechenden Säureadditionssalzen mit einer Sulfonsäure oder mit Schwefelsäure beschrieben.

In dieser Publikation wird nichts von einer direkten, selektiven Kristallisation der (6S)-THF in der Form der freien Säure erwähnt.

Das in EP 0 495 204 A1 beschriebene Verfahren beinhaltet unnötige Stufen, nämlich die Herstellung von Säureadditionssalzen und deren Umwandlung in die freie Säure.

Die fraktionierte Kristallisation dieser Säureadditionssalze muss offenbar gemäss den in den Beispielen beschriebenen Ausführungsformen stets in Gegenwart eines Antioxidationsmittels, wie etwa Mercaptoethanol, durchgeführt werden.

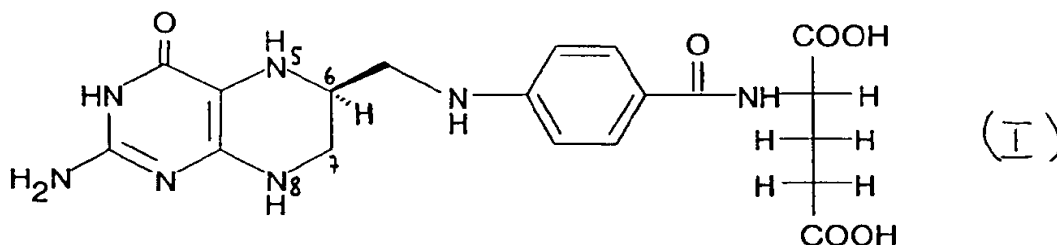
Dieses Verfahren ist nicht wirtschaftlich und nicht umweltfreundlich, da als Nebenprodukte bei der Freisetzung der Säure aus dem Säureadditionssalz mindestens ein Äquivalent eines Sulfonsäure- oder Schwefelsäuresalzes entsteht, welches beseitigt werden muss.

Eine direkte, selektive Kristallisation von (6S)-THF in der Form der freien Säure ist bis jetzt noch nicht beschrieben.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von (6S)-THF zur Verfügung zu stellen, bei dem eine direkte, selektive Kristallisation von (6S)-THF in der Form der freien Säure verwendet wird.

Völlig überraschend wurde gefunden, dass innerhalb von bestimmten pH- und Temperaturbereichen (6S)-THF selektiv kristallisiert werden kann.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure- abgekürzt mit (6S)-THF - der Formel I



mit einer diastereoisomeren Reinheit von wenigstens 75 % ist dadurch gekennzeichnet, dass man zu einer wässrigen Lösung eines (6RS)-Diastereoisomerengemisches eines Alkalimetallsalzes von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure bei einer Temperatur von 5 °C bis 80 °C zwecks selektiver Kristallisation so lange portionenweise Säure hinzugibt, bis sich der pH-Wert auf einen Wert im Bereich von 4,8 bis 5,3 stabilisiert hat, und den entstandenen Festkörper, nämlich (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, abtrennt.

Bevorzugte Ausführungsformen dieser Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen definiert.

Das im erfindungsgemässen Verfahren verwendete Ausgangsmaterial, beispielsweise das Dinatriumsalz von (6RS)-THF, kann gemäss E. Khalifa et. al., Helv. (1980), 63, 2554 hergestellt werden.

Dieses Ausgangsmaterial kann man auch dadurch erhalten, indem man das (6RS)-Diastereoisomeren-gemisch von THF, vorzugsweise in Gegenwart des Dinatriumsalzes von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), unter einer Inertgasatmosphäre bei einer Temperatur von etwa 35 °C im Wasser suspendiert, und solange wässrige Natronlauge zutropft, bis man eine homogene Lösung erhält. Diese Lösung hat normalerweise einen pH-Wert von etwa 6,5.

Zwecks Stabilitätserhöhung ist es vorteilhaft, den pH-Wert dieser Lösung auf einen Wert von 5,5 bis 5,0 mittels der Hinzugabe einer der genannten bevorzugten Säuren einzustellen.

Danach wird diese Lösung vorzugsweise auf eine Temperatur von 40 °C bis 50 °C, insbesondere 45 °C, erwärmt.

Anschliessend wird zwecks selektiver Kristallisation von (6S)-THF so lange Säure hinzuge tropft, bis sich der pH-Wert auf einen Wert im Bereich von 4,8 bis 5,3, vorzugsweise 4,9 bis 5,2, insbesondere 5,0, stabilisiert hat.

Man beobachtet die Bildung eines kristallinen Festkörpers während dieser Säurehinzugabe.

5 Der kristalline Festkörper wird abgetrennt, beispielsweise mittels Filtration oder Zentrifugation, und in üblicher Art gewaschen und getrocknet.

Generell wurde festgestellt, dass bei einem relativ tiefen pH-Wert, beispielsweise 4,5, eine geringere Kristallisationsselektivität (6S) versus (6R) verbunden mit einer relativ hohen Ausbeute erhalten wird.

Bei einem höheren pH-Wert, beispielsweise 5,0, ist die Kristallisationsselektivität besser, aber die  
10 Ausbeute ist geringer.

Entsprechende genaue Daten sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

pH-Wert	Temperatur	Verhältnis (6S)/(6R)-THF	Ausbeute %
5,2	35 ° C	80 : 20	45
5,0	25 ° C (14h)	77 : 23	54
4,8	40 ° C	75 : 25	54
4,5	45 ° C	67 : 33	67
5,0	50 ° C	80 : 20	48
4,5	70 ° C	64 : 36	55
5,0	45 ° C	80,5 : 19,5	48

Die selektive Kristallisation ist normalerweise nach höchstens 1 Stunde abgeschlossen.

25 Für die Gewinnung von diastereoisomerenreiner (6S)-THF kann das erfindungsgemässe Verfahren mehrmals hintereinander durchgeführt werden.

Die folgende Tabelle beschreibt die Umkristallisation eines Diastereoisomerengemisches von 80% (6S)- und 20 % (6R)-THF bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten:

pH-Wert	Temperatur	Verhältnis (6S)/(6R)-THF	Ausbeute %
5,0	50 ° C	89 : 11	86
5,6	25 ° C	94 : 6	66
5,2	45 ° C	92 : 8	75

35 (6R)-THF kann, falls gewünscht, aus der Mutterlauge erhalten werden.

Dazu wird ein Äquivalent eines Calciumsalzes, beispielsweise ein Calciumhalogenid, wie Calciumchlorid und Calciumbromid, Calciumacetat, bezogen auf die anwesende Menge an THF, als Festkörper zur Mutterlauge gegeben.

40 Anschliessend gibt man eine Base, beispielsweise wässrige Natronlauge, hinzu, bis man einen pH-Wert von etwa 6,0 erhält.

Die Lösung wird teilweise eingeeengt, beispielsweise auf eine Konzentration von 10 % an THF in der eingeeengten Lösung.

Aus dieser eingeeengten Lösung kristallisiert in etwa 2 Stunden (6R)-THF in der Form des Calciumsalzes  
45 aus.

Die nachfolgenden Beispiele illustrieren die vorliegende Erfindung.

#### Beispiel 1

50 100,0 g (6RS)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, hergestellt nach E. Khalifa et al. Helv., (1980), 63, 2554, und 2,0 g des Dinatrium Salzes der Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurden unter einer Stickstoffatmosphäre bei einer Temperatur von 35 ° C in 750 ml Wasser suspendiert.

Es wurde solange 20%-ige wässrige Natronlauge hinzuge tropft, bis man eine homogene Lösung erhielt, welche einen pH-Wert von 6,5 zeigte.

55 Dann wurde das Gemisch stark gerührt. Durch tropfenweise Zugabe von 18%-iger, wässriger Salzsäure wurde der pH-Wert bis auf einen Wert von 4,8 gebracht. Die Temperatur wurde anschliessend auf 45 ° C erhöht.

Nach einigen Minuten bei der genannten Temperatur beobachtete man die Bildung eines kristallinen Festkörpers, wobei gleichzeitig der pH-Wert der Suspension zu steigen begann.

Durch Zugabe von 18%-iger wässriger Salzsäure wurde der pH-Wert bei 5,0 gehalten, bis sich nach ungefähr 45 Minuten dieser Wert stabilisiert hatte.

Der weisse, kristalline Festkörper wurde mittels Filtration isoliert, einmal mit Wasser und einmal mit Aceton gewaschen und dann unter vermindertem Druck bei einer Temperatur von 50 °C getrocknet.

Auf diese Weise erhielt man 48 g an kristalliner 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure.

Zur Bestimmung des Diastereoisomeren-Verhältnisses wurde eine Probe des erhaltenen Produktes gemäss K.O. Donaldson und Keresztesy J.C., J. Biol. Chem., (1962), 237, 3815 oder V.S. Gupta und F.M.

Huennekens, Arch. Biochem. Biophys. (1967), 120, 712 in N(5)-CH<sub>3</sub>-THF umgewandelt.

Das so erhaltene Produkt wurde an einer chiralen Säule (RESOLVOSIL) analysiert.

Es wurde ein Diastereoisomeren-Verhältnis von (6S)/(6R) = 80.5/19.5 ermittelt.

HPLC-Analyse (reverse phase-Säule): 99,3 %

Wassergehalt nach Karl Fischer : 7.5 %

Chlorid Gehalt : 0 %

## Beispiel 2

40 g des gemäss Beispiel 1 erhaltenen Produktes wurden in 500 ml Wasser suspendiert und in Analogie zu Beispiel 1 behandelt.

Die selektive Kristallisation der freien Säure erfolgte bei einem pH-Wert von 5,2.

Man erhielt 30,2 g an kristalliner 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure mit einem Diastereoisomeren-Verhältnis von (6S)/(6R) = 93 / 7.

HPLC-Analyse (reverse phase-Säule) : 99,1 %

Wassergehalt nach Karl Fischer: 5,7 %

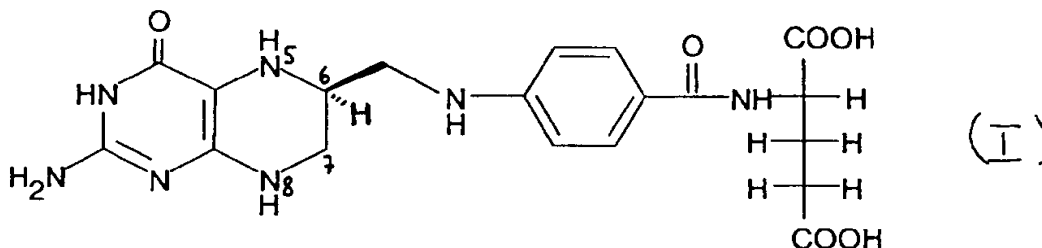
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -32,5° (c = 1, 0,04 N NaOH, pH = 9,5)

Chlorid Gehalt : 0 %

Elementaranalyse	berechnet (%)	gefunden (%)
C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> · 1,5 H <sub>2</sub> O	C 48,32 N 20,76 H 5,55	48,59 21,06 5,57.

## Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure- abgekürzt mit (6S)-THF - der Formel I



mit einer diastereoisomeren Reinheit von wenigstens 75 %,

dadurch gekennzeichnet, dass man zu einer wässrigen Lösung eines (6RS)-Diastereoisomerengemisches eines Alkalimetallsalzes von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure bei einer Temperatur von 5 °C bis 80 °C zwecks selektiver Kristallisation so lange portionenweise Säure hinzugibt, bis sich der pH-Wert auf einen Wert im Bereich von 4,8 bis 5,3 stabilisiert hat, und den entstandenen Festkörper, nämlich (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, abtrennt.

- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte wässrige Lösung des (6RS)-Diastereoisomerengemisches noch wenigstens ein Komplettierungsmittel für Schwermetalle enthält,

vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Ethylen-diamintetraessigsäure, abgekürzt mit EDTA, und deren Salze und Hydrate, insbesondere das di-Natriumsalz, Nitrilotriessigsäure, 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, wobei EDTA und deren di-Natriumsalz bevorzugt sind.

- 5 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe von Säure und die gleichzeitig stattfindende selektive Kristallisation bei einer Temperatur von 40 °C bis 50 °C erfolgt.
- 10 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Säure ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Halogenwasserstoffsäuren, insbesondere Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Trichloressigsäure, Trifluoressigsäure, Methansulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, insbesondere wässrige Lösungen dieser Säuren.
- 15 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man den pH-Wert auf einen Wert im Bereich von 4,9 bis 5,2, insbesondere 5,0, stabilisiert.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die ganze Reaktion unter Inertgasatmosphäre ausgeführt wird.
- 20 7. Verwendung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure als Ausgangsmaterial zur Herstellung von (6S)-N(5)-Formyl-THF, (6S)-N(5)-Methyl-THF und (6R)-N(5),N(10)-Methylen-THF.

25

30

35

40

45

50

55



European Patent  
Office

## EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number  
EP 93 11 9354

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.5)
A	EP-A-0 367 902 (EPROVA) *Insgesamt* ---	1	C07D475/04 C07D487/14
A	EP-A-0 293 029 (EPROVA) *Insgesamt* ---	1	
A	EP-A-0 348 641 (EPROVA) *Insgesamt* ---	1	
A	EP-A-0 455 013 (SAPEC) *Insgesamt* ---	1	
D,A	EP-A-0 495 204 (EPROVA) *Insgesamt* ---	1-7	
D,A	WO-A-91 13890 (SAPEC) *Seiten 33-38* -----	1	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.5)
			C07D
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 7 February 1994	Examiner Luyten, H
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons * : member of the same patent family, corresponding document			

EPO FORM 1503 01.92 (P04C04)